Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln

Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

Wirkung von leucocytotischem menschlichen Plasma auf die Proliferation menschlichen Knochenmarkes in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dorit G e r h a r d t , geb. Boxheimer
aus Berlin

1968

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln

Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

Wirkung von leucocytotischem menschlichen Plasma auf die Proliferation menschlichen Knochenmarkes in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dorit G e r h a r d t , geb. Boxheimer

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr. med. Wilhelm M a ß h o f f

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 23. August 196[illegible]

Inhaltsübersicht

		Seite
I.	Regulationsmechanismen der Granulopoese	1
	1. Allgemeine Betrachtung	1
	2. Die nervale und hormonale Regulation	2
	3. Die humorale Regulation	2
II.	Methode	8
	1. Art der Knochenmarkkultivierung	8
	2. Bestimmung der Zellen in der weißen und roten Reihe	9
	3. Mitosephasenbestimmung	11
	4. Signifikanzberechnung	13
III.	Ergebnisse	13
IV.	Diskussion der verschiedenen Kombinationen der neun durchgeführten Versuche mit aus der Literatur bekannten Hypothesen und Fakten	26
	1. Reaktion von normalem und in der Granulopoese angeregtem Knochenmark auf Leucocytoseplasma	27
	2. Reaktion von myeloischem Knochenmark auf Normalplasma	29
V.	Zusammenfassung	31
VI.	Literaturverzeichnis	32
VII.	Lebenslauf	37

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0035

I. Regulationsmechanismen der Granulopoese

1. Allgemeine Betrachtung

Jede Infektion wird von Leucocytose und Linksverschiebung begleitet. Bei der Infektabwehr wird zuerst der marginale Granulocytenpool mobilisiert, d. h. die Masse der Granulocyten, die dem Endothel der Kapillarbetten in parenchymatösen Organen adhärent ist, danach die Knochenmarkreserve. Unter Knochenmarkreserve versteht man denjenigen Teil der Granulocyten, der nach seiner Bildung nicht sofort ins Blut ausgeschüttet wird, sondern noch eine Zeit lang im Knochenmark verbleibt. Sind sowohl der 'Marginalpool' als auch die Granulocytenreserve im Knochenmark durch langanhaltende Infektion aufgebraucht, wird das Knochenmark nach links verschoben, d. h. aus dem normalen myelocytär-metamyelocytären Knochenmark wird ein promyelocytär-myelocytäres (MÜLLER, FIESCHI). Das Verhältnis der weißen zu den roten Zellen im Knochenmark, genannt G/E-Index, nimmt dabei stark zu. Da Reifung und Regeneration gleichzeitig vor sich gehen, ist der Granuloblastenmitoseindex kaum verändert. Die durch Infekte angeregte Granulopoese zeigt nach CRONKITE's Versuchen mit Thymidin, das durch Tritium markiert wurde, eine Verkürzung der Reifungszeit von normalerweise 4-6 Tagen auf 2 Tage. Zum Teil findet sich an den Zellen eine Dissoziation der Kern-Plasmareifung. Dabei ist der Kern nahezu ausgereift, während das noch basophil gefärbte Plasma dunkle toxische Granulationen zeigt.

2. Die nervale und hormonale Regulation

Über die Regulationsmechanismen der Granulopoese ist bisher folgendes bekannt:
CALVO wies darauf hin, daß mit der A. nutritiva ein Nerv ins Knochenmark zieht, der sich fünffach teilt und mit feinen Endigungen in die Arterienwand einsenkt, so daß eine empfindsame Reizaufnahme und - abgabe gewährleistet ist. KOMIYA konnte bei röntgenbestrahlten und bei mit Typhusvaccine injizierten Kaninchen keine Leucocytose feststellen, wenn das Rückenmark oberhalb des 3. Dorsalsegments durchtrennt war; das gleiche Ergebnis fand sich nach Exstirpation des Ganglion coeliacum oder nach Durchtrennung seiner Leber- und Milzäste bzw. der Äste vom N. splanchnicus minor zur Nebenniere. Die extramedulläre Hämatopoese wird durch Exstirpation des Ganglion coeliacum ebenfalls gehemmt, während sie nach Durchschneiden des N. vagus unterhalb des Zwerchfells gefördert wird. Gibt man aber den eben beschriebenen Tieren ACTH, NNR-Hormone oder Adrenalin, so tritt eine Leucocytose auf; denn durch den Reiz, den Röntgenstrahlen, Typhusvaccine u.a. darstellen, wird die Nebenniere ausgeschaltet.

3. Die humorale Regulation

TEIR und RYTÖMAA überprüften als erste die Arbeitshypothese der Hämatologen, nach der die Granulocyten granulopoetische Faktoren enthalten, die beim Zugrundegehen der Leucocyten frei werden. Sie brachten in vitro Rattenknochenmarkkulturen mit Ascitesflüssigkeit zusammen, deren Zellen 60-80% abgestorbene Granulocyten enthielten. Beide Zellsuspensionen berührten sich nicht, da sie durch eine semipermeable Membran getrennt waren. Sie wurden 3 bis 48 Stunden incubiert. Es resultierte ein Anstieg aller Knochenmarkzellen. Die segmentkernigen Granulocyten waren relativ und absulut gesehen bedeutend gestiegen; der G/E-Index und der Mitoseindex waren

ebenfalls erhöht.

WENDT und unabhängig von ihm WOOD fanden bei ihren Forschungen über die Pathogenese des Fiebers beim Menschen das sogenannte endogene Pyrogen:
Bei der intravenösen Injektion von bakteriellem Endotoxin zeigten sich erst nach 45 min Fieber und Leucocytose, der eine kurz dauernde Leucopenie voranging. Wurden jedoch für 3 h bei 37°C 0,5g Lipopolysaccharide aus S. abortus equi (LPS) in 40 - 100 ml Blut incubiert, das zuvor mit 10 - 20 mg Heparin ungerinnbar gemacht worden war, so traten bei den damit Behandelten Fieber und Leucocytose ohne Anfangsleucopenie schon nach 10 - 30 min auf. Es wird angenommen, daß das Endotoxin sich dabei an die Leucocyten anlagerte und die Reaktion zwischen beiden das endogene Pyrogen freisetzte, das offenbar in inaktiver Form bereits in den Leucocyten vorhanden war. Das endogene Pyrogen soll kein Abbau- oder Sekretionsprodukt, sondern ein Produkt der intakten Leucocyten sein, die durch osmotische Lyse oder Plasmafaktoren verändert wurden. Als humoraler Überträger soll es auf das Knochenmark und auf das Temperaturregulationszentrum im Hypothalamus wirken.
Zur Gewinnung endogenen Pyrogens darf ausschließlich frisches Blut verwandt werden; bereits für 24h bei 4°C gelagertes Blut bildet kein endogenes Pyrogen mehr. Durch Schütteln des Blutes erhöht sich der Pyrogengehalt. Weiterhin muß auf Pufferung des Blutes geachtet und Glucose zugefügt werden. Eine niedrige Zellkonzentration des Blutes ergibt eine hohe Konzentration an endogenem Pyrogen; ein bestimmtes Minimum an Zellgehalt darf jedoch nicht unterschritten werden. Bei 70°C wird endogenes Pyrogen inaktiv, d.h. es ist relativ hitzelabil. Es ist nicht dialysierbar, aber durch Perchlorsäure zu präzipitieren, ferner durch Phenol extrahierbar und durch Trypsin und Pepsin zu zerstören. Nach Verabfolgung pyrogenhaltigen Blutes tritt keine Gewöhnung ein wie nach bakteriellem Endotoxin.

KOMIYA schloß auf einen humoralen Überträger der Leucocytose, weil nach Injektion des leucocytotischen Serums eines Kaninchens mit durchtrennten Nervenapparaten bei einem anderen entnervten Kaninchen ebenfalls Leucocytose hervorgerufen wurde. Diesen Überträger-Stoff nannte er Neutropoetin. KOMIYA glaubt, daß die nervöse Regulation der Granulocytenzahl vom N. vagus und vom N. splanchnicus übernommen wird, die ihrerseits diencephal, hypophysär und cortical beeinflußt werden. Unter dem Einfluß der vegetativen Nerven sollen Leber und Milz Wirkstoffe wie z.B. Neutropoetin bilden. Ganz allgemein ist KOMIYA der Ansicht, daß Nebennierenrindenhormone die Produktion von Neutropoetin erleichtern.
Neutropoetin kann als weißes, kristallines Polypeptid mit einem Schmelzpunkt von 198°C isoliert werden. Es ist undialysierbar und zeigt die Biuret-, Ninhydrin-, Millon- und Xanthoproteinreaktion. Mit dem Neutropoetin meint KOMIYA erst e i n e n der blutregulierenden Stoffe gefunden zu haben. Er unterteilt sie hypothetisch in einen Austreibungsstoff, der die Blutzellen aus den Depots hervorbringt, in einen Stoff, der sie dort zurückhält und in blutbildungsfördernde Stoffe für jede Zellart. (So Neutropoetin, Eosino-, Mono-, Baso-, Lympho-, Erythro- und Thrombopoetin).

GORDON fand mit Hilfe der Leucopherese (Leucocytenentzug durch wiederholte Blutabnahme) an parabiotischen Ratten einen Leucocytose induzierenden Faktor (LIF). Er nahm dem einen Paarling der Parabiose-Ratten Leucocyten ab, worauf der andere mit einem signifikanten Leucocytenanstieg reagierte. Durch die Leucocytenabnahme wurde auf irgendeine Weise die Bildung des sogenannten LIF angeregt, der über die Parabiosebrücke im anderen Tier Leucocytose hervorrief. Das Plasma des leucopheretischen Teils des Rattenpaares in intakte, adrenalektomierte und hypophysektomierte Ratten injiziert, ergab immer eine Leucocytose, die durch eine starke Abnahme der Granulocyten im Knochenmark und durch ein deutliches Ansteigen der Leucocytenausschüttung in isoliert durchströmten Rattenbeinen gekennzeichnet war. Jugendliche Granulocyten wurden ebenfalls ausgeschüttet. Die Verabreichung von Prednisolon, Adrenalin, Histamin, Serotonin und

Pyrogenen zeigte diese Effekte nicht.

BIERMAN entdeckte ebenfalls im leucocytotischen Serum einen Stoff und nannte ihn Leucopoetin G. Dieser Stoff rief, bei Ratten intraperitoneal verabfolgt, allein durch Anstieg der Granulocyten ohne selektive Vermehrung der unreifen Vorstufen eine Leucocytose hervor, wie wiederholte Kontrollen der Gesamtleucocytenzahl und des Differenzialblutbildes zeigten. Die hohe Leucopoetinaktivität im Serum leucopenischer Individuen und die Befunde nach Leucapherese an leucämischen Patienten (keine Verschiebung des Differenzialblutbildes, keine Veränderung des Knochenmarkes, Blockierung des Übergangs der Leucocyten vom Gewebe zum Blut) lassen BIERMAN vermuten, daß sich das Leucopoetin G aus einer leucopoetischen Komponente, einem Reifungsfaktor und einem die Einschwemmung der Leucocyten regulierenden Faktor zusammensetzt. Die Tatsache, daß Leucopoetin G in wäßrigem Plasmaextrakt und im Urin vorhanden und dialysierbar ist, weist darauf hin, daß es sich um eine kleinmolekulare Substanz von Nicht-Protein-Charakter handelt, die im Plasma an ein größeres Protein gebunden ist, das angeblich als unspezifischer Hemmstoff wirken soll.

MENKIN unterscheidet zwei Faktoren im leucocytotischen Serum, den Leucocytes-Promoting-Factor (LPF) und den Leucocytose-Faktor. Sie isolierte aus einem anfangs alkalischen Exsudat den Leucocyten-Bewegungsfaktor, der sich als thermolabiles α-Globulin darstellte. Aus dem sauren Exsudat dagegen extrahierte sie den thermostabilen Leucocytosefaktor. Außerdem waren in beiden Exsudaten Leucopeniefaktoren vorhanden. Das thermolabile Leucopenin, ein Teil des LPF, verursacht die Anfangsleucopenie, die der Leucocytose vorangeht. Der thermostabile leucopenische Faktor verursacht durch das Einwandern der Granulocyten in Lunge, Leber und Milz eine Leucopenie. MENKIN injizierte Hunden intravenös zellhaltiges oder zellfreies, alkalisches oder saures Exsudat, das sie anderen Hunden mit steriler Pleuritis entnommen hatte. Die untersuchten

Hunde zeigten nach einstündiger Anfangsleucopenie eine Leucocytose, wie Kontrollen der Gesamtleucocytenzahl und des Differenzialblutbildes bestätigten. STORER, SANDERS und LUSHBAUGH haben die Effekte des LPF von MENKIN überprüft, indem sie letal bestrahlten Mäusen steriles Hundeplasmaexsudat intravenös oder intraperitoneal gaben. Die Überlebensrate von 30 Tagen wurde dadurch jedoch nicht signifikant erhöht. LPF wurde in der Leber, der Milz und der Niere gefunden. Allerdings ist die Annahme, daß die Milz LPF sezerniert, noch nicht gesichert.

LINMANN spricht ebenfalls von einem Faktor, der Leucocytose hervorruft. Er benannte ihn Leucopoesefaktor und isolierte ihn ätherlöslich und thermostabil aus Polycythämieplasma. Dieser Stoff soll den G/E-Index im Rattenknochenmark vergrößern.

STEINBERG fand, daß das normale menschliche, durch kontinuierlich fließende Elektrophorese getrennte Serumalbumin, Kaninchen intravenös injiziert, eine Proliferationshemmung des Knochenmarkes bewirkt. Diese wurde von einer Anämie, Granulocyto- und Thrombocytopenie im peripheren Blut begleitet. Später erhielt er aus dem Serumalbumin lediglich durch Behandlung mit Natriumtetrametaphosphat und bei ständig fließender Elektrophorese fünf verschiedene Faktoren, die aber noch nicht vollständig chemisch getrennt werden konnten. Zwei Faktoren hatten keinen Einfluß auf Blut und Knochenmark, einer von beiden steigerte jedoch die Lymphocytenbildung und ließ Milzfollikel hyperplastisch werden. Ein dritter vergrößerte Produktion und Reifung von Granulo- und Erythrocyten im Knochenmark und führte im peripheren Blut zu erhöhter Erythrocytenzahl und Leucocytose. Der vierte Faktor hemmte den dritten und der fünfte verhinderte die Granulocytenreifung. Nach Injektion der Serumalbuminfraktionen untersuchte STEINBERG den Hämoglobingehalt, die Erythrocyten- und Gesamtleucocytenzahl, das weiße Differenzialblutbild und die Thrombocyten- und Retikulocytenzahl des

peripheren Blutes. Am Knochenmark stellte er Veränderungen in der Gesamtzellzahl, in der Granulocytenreifung, in der Erythro- und Megakaryocytopoese sowie in der Differenzialzellzahl fest.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen entwickelte STEINBERG seine Theorie über die Hämatopoese, die folgendes beinhaltet:
Jede Zellreihe wird von einem Paar von Regulatoren beeinflußt. Dabei ist der eine Teil verantwortlich für Zellproliferation und Reifung, der andere dagegen hält beide Funktionen auf einem physiologischen Niveau. So gibt es ein Granulocytopoesin und -penin, ein Erythrocytopoesin und -penin und ein Megacaryocytopoesin. Außerdem sollen die Leucocyten aus dem Mark durch einen sogenannten Expulsionsfaktor ausgestoßen werden, der beim Zerfall der Leucocyten frei wird. Ein Antiexpulsionsfaktor, von Milz und lymphatischem Gewebe sezerniert, soll ein Überschießen des ersteren verhindern.

Während die von GORDON, KOMIYA, BIERMAN und MENKIN untersuchten Faktoren durch Ausschüttung der Knochenmarkreserve und des marginalen Granulocytenpools vorwiegend auf die Blutleucocyten wirkten, blieb das Knochenmark mehr oder weniger unbeeinflußt. Teilweise wurde auch nur das Blutbild, nicht aber das Knochenmark untersucht.
Erst STEINBERG fand bei seinen in vivo-Versuchen Faktoren, die das Knochenmark direkt verändern, indem sie Zellproliferation und Reifung hemmen oder fördern.
GIDALI und FEHER untersuchten ebenfalls Knochenmark, und zwar speziell die Wirkung von leucocytotischem und leucopenischem Kaninchenserum auf normales Kaninchenknochenmark in vitro. Sie erzielten Leucocytose durch Injektion von Stärkelösung. Fünf min nach der Injektion nahmen sie das leucopenische, 1 h danach das leucocytotische Serum ab. Nach 1 h zeigte das Blut zwar noch keine Leucocytose, aber sie glaubten, daß der leucocytotische Faktor noch vor Ausprägung der peripheren Leucocytose maximal im Blut vorhanden

sein müßte. Das so gewonnene Serum wurde mit dem Knochenmark als flüssige Kultur mit Tyrode- und Glukosezusatz sowie mit Antibiotica und C^{14}-Formiat bei 37°C in Θ_2-Atmosphäre incubiert. In 1ml der Kultur wurde mit dem Hämocytometer die Zellzahl ermittelt und durch den Gasstromdetektor in 0,2 ml die Formiatactivität gemessen. Außerdem wurden im nach GIEMSA gefärbten Präparat 500 Zellen pro Ausstrich angesehen.

GIDALI und FEHER nahmen auf Grund ihrer Untersuchungen an, daß in der leucopenischen Phase ein Faktor existiert, der die Mitosen stimuliert, in der leucocytotischen ein anderer, der erst die Teilung und dann die Reifung steigert. Die Schwäche ihrer Arbeit liegt in der Auszählung der Gesamtzellzahl des Knochenmarkes, da der Anteil der roten und weißen Zellen nicht genau festgestellt werden konnte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht nun darin zu zeigen, ob und wie die im Leucocytoseserum angenommenen Faktoren auf menschliches Knochenmark in vitro wirken. Der Vorteil der dafür verwandten Methode liegt einmal in der Verwendung der Knochenmarkkultur, wobei hormonale und nervale Einflüsse ausgeschaltet werden und die schwer zu beurteilende Ausschwemmung nicht berücksichtigt zu werden braucht, und zum anderen in der Verwendung von Knochenmark und Blut vom Menschen, da die Ergebnisse von Tierexperimenten nicht direkt auf menschliche Verhältnisse übertragen werden können.

II. Methode

1. Art der Knochenmarkkultivierung

Nach einer Sternalpunktion der untersuchten Patienten wurden vom Knochenmark sofort Originalausstriche angefertigt. Das übrige Material wurde in eine Heparinlösung (3 mg% in

HANKS-Lösung) gespritzt und nach der von BOLL modifizierten CARREL'schen Deckglasmethode kultiviert. Ein Teil des Knochenmarkes wurde zur Kontrolle mit Eigenplasma, ein anderer mit Fremdplasma als Versuch auf die folgende Weise angesetzt. Zur Gewinnung des Eigen- wie des Fremdplasmas wurde Blut von dem jeweiligen Patienten in einem silikonisierten, in Eis verpackten Zentrifugenröhrchen im Kühlschrank aufbewahrt, bis sich das Plasma abgesetzt hatte. Das Fremdplasma stammte meist von Patienten, die eine hochgradige Leucocytose aufwiesen. Unter sterilen Bedingungen wurde auf einen Objektträger ein Tropfen eines Nährmediums gegeben, das zu 50% aus Nativplasma, zu 10% aus Corhormon dreifach verstärkt (Chemiewerk Homburg) und zu 40% aus HANK's Lösung bestand. Auf den coagulierten Tropfen wurde ein Knochenmarkbröckchen gesetzt und darauf ein Tropfen Serum pipettiert. Nach Beschickung der Objektträger wurde die Kultur luftdicht verschlossen, indem darübergedeckte Hohlschliffobjektträger an ihren Rändern mit verflüssigtem Hartparaffin bestrichen wurden. Durch Umdrehen des Objektträgers entstanden so Kulturen am hängenden Tropfen, die bei 37°C im Brutschrank eingeschlossen blieben. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden sie ausgestrichen und nach PAPPENHEIM gefärbt.

2. Bestimmung der Zellen in der weißen und roten Reihe

Aus den Präparaten werteten wir insgesamt 77000 Zellen aus, indem wir aufgelockerte Gebiete mäanderförmig durchstreiften. Von den neun untersuchten Patienten zählten wir bei Fall 1, 2, 3 und 4 1000 - 2000 Knochenmarkzellen, die sich aus Zellen der roten und weißen Reihe, aus Plasma- und Reticulumzellen, aus Megacaryo-, Mono- und Lymphocyten zusammensetzten. Bei den übrigen Fällen wurden nur weiße Zellen gezählt.

In der weißen Reihe wurden folgende Zelltypen differenziert:
Als Stammzelle wurde der 12-20 µm große Myeloblast (Mb) betrachtet. Seine Kernplasmarelation ist zugunsten des ovalen bis runden, feinstrukturierten, teils mit zarten Nucleolen versehenen Kerns verschoben. Das von azurophiler Granulation noch freie Cytoplasma ist schwach bis deutlich basophil, in Kernnähe aber an einer Stelle als sogenanntes Cytozentrum aufgehellt.
Der sich daraus entwickelnde Promyelocyt (Pm) hat eine Größe von 16-27 µm, was auf ein Anwachsen des noch basophilen Plasmas zurückzuführen ist, das von grober oder feiner azurophiler Granulation durchsetzt ist.
Die nächste Reifungsstufe stellt der 12-18 µm große Myelocyt (My) dar, dessen Kernplasmarelation der des Promyelocyten ähnelt. Nur ist die Zelle kleiner und der ovale bis nierenförmige Kern verdichtet. Das Plasma zeigt sich entweder neutrophil, eosinophil oder basophil granuliert.

Mit der Heranbildung zum Metamyelocyten (Meta) wird der Kern grobscholliger und buchtet sich stärker ein als beim Myelocyten.
Aus den Metamyelocyten reift der stabkernige Granulocyt (St) heran, der kleiner als seine Vorstufe ist und dessen dichte Kerne Stabform zeigen. Das Plasma des Metamyelocyten und des stabkernigen Granulocyten bleibt gegenüber dem Myelocytenplasma unverändert.
Die differenzierteste Form der weißen Reihe bildet der segmentkernige Granulocyt (Seg), der bei einer Größe von 10-15 µm meist 3-5 strukturlose Kernsegmente aufweist, die über fadenförmige Chromatinbrücken miteinander verbunden sind.
Der eosinophile und basophile Metamyelocyt wurde den eosinophilen und basophilen Myelocyten, der eosinophile und basophile stabkernige Granulocyt den eosinophilen und basophilen segmentkernigen Granulocyten zugeordnet. Diese Zellen fielen zahlenmäßig kaum ins Gewicht.

In der roten Reihe wurden folgende Zelltypen differenziert:
Als Stammzelle wurde der 15 - 22µm große Proerythroblast (PE) angesehen. Der große runde Kern zeigt ein dichtes, gleichmäßig strukturiertes Chromatin, oft mit mehreren Nucleolen. Das stark basophile Plasma weist eine schmale nucleäre Aufhellung auf.
Die nächste Entwicklungsstufe stellt der basophile 8 - 15µm große Erythroblast (bE) dar. Sein Kern ist kleiner, das Chromatin grobscholliger und schon radiär angeordnet, das Plasma noch basophil.
Beim polychromatischen Erythroblasten (pE) verliert das Plasma durch Hämoglobinaufnahme die Basophilie und nimmt einen graublauen bis graurosa Farbton an. Sein Zellkern ist noch kleiner und dichter als der der Vorstufe.
Belädt sich die Zelle noch mehr mit Hämoglobin und wird ihr Plasma rosa bis orangefarben, so entsteht der oxyphile Erythroblast (oE), 7-10µm groß, der sich nach Verklumpung des Kernchromatins in den reifen Erythroblasten (rE) umwandelt.

3. Mitosephasenbestimmung

Neben der Differenzialzellzählung wurden auch Mitosen bestimmt. Der Mitoseindex errechnete sich aus der Anzahl der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen. Als teilungsfähige rote Zellen wurden der Proerythroblast, der basophile, polychromatische und oxyphile Erythroblast bezeichnet. In der weißen Reihe rechneten der Myeloblast, Promyelocyt, Myelocyt und - da BOLL annimmt, daß 2/3 aller Metamyelocyten noch teilungsfähig sind, sich aber in der Mitose schlecht von denen der Myelocyten unterscheiden lassen - der Metamyelocyt zu den teilungsfähigen Zellen.

Die Mitosen teilten wir in folgende Phasen ein:
Als in Prophase befindlich galt eine Zelle, wenn ihre Kernstruktur gröber als normal und Kernmembran und Nucleolus aufgelöst waren (festes Spirem).
Lagen die Chromosomen schon über die ganze Zelle hin verstreut, wurde die Phase frühe Metaphase genannt.
In der späten Metaphase bildeten die Chromosomen den Monaster, der je nach Lage der Zelle auch als Äquatorialplatte erschien. Die Zelle ist noch rund.
Nimmt sie aber längliche Gestalt an und zeigen sich zwei Äquatorialplatten oder ein Diaster, so befindet sich die Zelle in der Anaphase.
In der Telophase zeigen die Zellen ein lockeres Dispirem und eine beginnende bis abgeschlossene Durchschnürung des Cytoplasmas.
Die Zeit, in der sich das Kernmaterial zum festen Dispirem entwickelt und mit einer Kernmembran umgibt, wurde als Rekonstruktionsphase gezählt. Beide Tochterzellen sind häufig noch durch ein dünnes Plasmafädchen miteinander verbunden.

Die prozentuale Verteilung der Mitosephasen stellten wir in karyologischen Kurven dar, die getrennt für Kontrolle und Versuch in der weißen Reihe aufgezeichnet wurden. In der roten Reihe wurden wegen zu geringer Anzahl der gezählten Erythroblasten keine Kurven angefertigt. Außerdem errechneten wir für jedes Präparat in den Fällen 1-4 den G/E-Index, das Verhältnis der weißen zu den roten Zellen.

Die Ergebnisse der Zelldifferenzierung und Mitosezählung wurden in Tabellen und Kurven aufgezeichnet. Wegen der besseren Übersicht rechneten wir in den Kurven eosinophile, basophile und neutrophile Myelocyten zu den Myelocyten, eosinophile, basophile und neutrophile segmentkernige Granulocyten zu den segmentkernigen Granulocyten.

4. Signifikanzberechnung

Ob die sich ergebenden Unterschiede in der Zellverteilung zufallsbedingt oder signifikant waren, errechneten wir nach dem χ^2-Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde nach dem errechneten χ^2-Wert aus statistischen Tabellen abgelesen (vgl. LINDER). Als signifikant bezeichneten wir Ergebnisse, deren Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1% war. Bei der Signifikanzberechnung der Zellzahl in Kontrolle und Versuch wurden in der weißen Reihe 6 Exponenten (Mb Pm My J St Seg) und in der roten Reihe 5 (Pb bE pE oE rE) verglichen. Bei der Mitosesignifikanzberechnung stellten wir die Zellen in und ohne Mitose in Kontrolle und Versuch gegenüber.

III. Ergebnisse

Zu unseren Versuchen wurden wie o. a. neun Patienten ausgewählt. Während bei Fall 3, 4 und 5 fast normales Knochenmark von Patienten ohne Leucocytose kultiviert wurde, verwendeten wir bei Fall 1, 2, 6 und 7 in der Granulopoese angeregtes Knochenmark mit teilweise hoher Leucocytose und schließlich bei Fall 8 und 9 Knochenmark von Patienten mit chronisch myeloischer Leucämie.

Die Daten und Untersuchungsergebnisse der neun Patienten werden anschließend jeweils in folgender Weise wiedergegeben

1.) Daten aus den Krankengeschichten der sternalpunktierten und der Fremdplasma spendenden Patienten
2.) Ergebnisse der Auszählung von Original- und Kulturausstrichen des Knochenmarkes
   a. Differenzialzellzählung (in Text und Kurven dargestellt)

b. Mitosen, teilungsfähige Zellen, Mitoseindices und G/E-Index (in Tabellen dargestellt).

Fall 1 (Abb. 1 und 2)

Hans T., 63 Jahre, klagte über Oberbauchbeschwerden, war ikterisch und zeigte eine normochrome Anämie mit zeitweilig erhöhtem Färbeindex. Die Laparaskopie deckte eine chronische Hepatitis auf, die später im Lebercoma zum Tode führte. Es wurden Antibiotica verabreicht. Das Sternalpunktat schloß eine Perniciosa aus, wies aber eine Linksverschiebung der weißen Reihe auf.
Das Blutbild zur Zeit der Punktion verhielt sich folgendermaßen:

Leuco	:	6000/mm^3
Eo	:	2
Pm	:	1
My	:	1
Meta	:	3
St	:	15
Seg	:	20
Lym	:	54
Mono	:	4

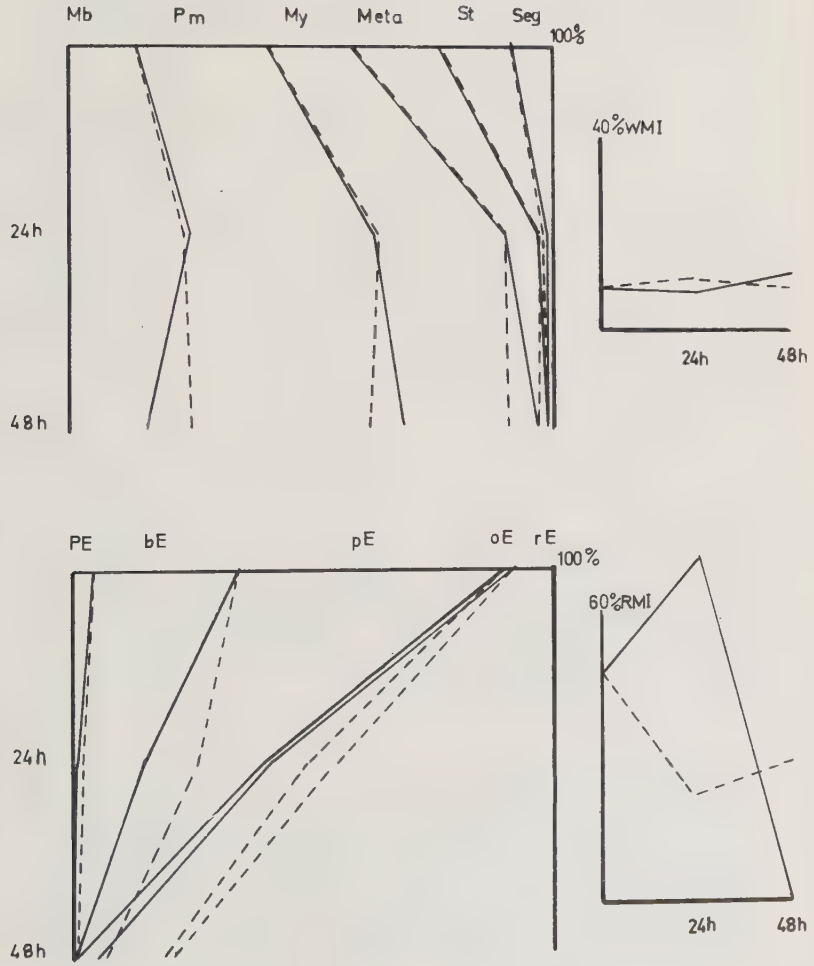
Ery	:	3,28 Mill/mm^3
Hb	:	10,2 g %
Hb_E	:	31 "

Das Leucocytoseplasma zu diesem Versuch stammte von einem Patienten mit 15 000 Leucocyten pro mm^3. Das Differenzialblutbild war links verschoben. Er wurde nicht antibiotisch behandelt.

Bei der Kulturauszählung fanden sich folgende Ergebnisse:

Das Originalpräparat zeigte in der weißen Reihe bei einer Myeloblasten- und Promyelocytenvermehrung eine Verminderung der reifen Granulocyten, war also links verschoben. In der 24-Stunden-Kultur ergaben sich bei Kontrolle und Versuch fast gleiche Werte, während in der 48-Stunden-Kultur bei Zusatz von Leucocytoseplasma eine stärkere Ausreifung zu verzeichnen war, die sich bei der Berechnung als signifikant erwies.

FALL 1



---- Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Abb.: 1,2

Die Erythropoese war im Original angeregt. Die Zellen reiften auf Fremdplasma zu beiden Zeiten langsamer als in den Kontrollen.
Der weiße Mitoseindex (MI) zeigte nach beiden genannten Zeiten fast gleiche Werte, während die großen Schwankungen im roten Mitoseindex durch die kleine Zellzahl bedingt waren.

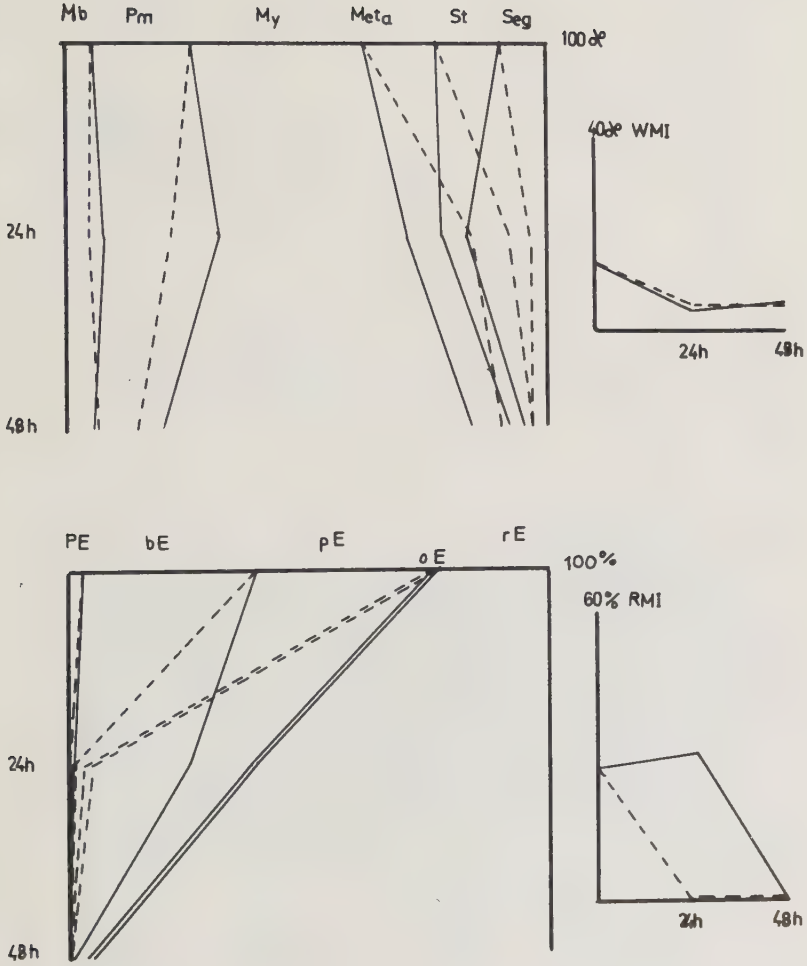
	Original	24 h		48 h	
		Kont.	Vers.	Kont.	Vers.
Granulopoese					
MI in ‰	8.7	7.5	10.5	11.8	9.1
Mitosen	12	14	14	18	13
teil.f.Z.	1386	1858	1332	1507	1439
Erythropoese					
MI in ‰	48.4	72.6	22.1	ø	28.6
Mitosen	17	17	5	ø	7
teil.f.Z.	351	234	226	7	70
G/E-Index	4.63	2.54	3.28	10.3	4.36

Der erhöhte G/E-Index im Ausgangspräparat ist durch die geringfügig vermehrte Granulopoese bedingt und geht in vitro nur vorübergehend zurück.

Fall 2 (Abb. 3 und 4)

Klaus-Jürgen K., 20 Jahre, hatte bei unklaren Temperaturen und erhöhter Blutsenkung Muskel- und Gliederschmerzen. Der Nachweis von LE-Zellen bestätigte den Lupus erythematodes visceralis, der mit Corticoiden behandelt wurde, nicht aber mit Antibiotica. Um eine Systemerkrankung auszuschließen, wurde er sternalpunktiert. Es zeigte

FALL 2



--- Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Abb. : 3,4

sich eine reticuläre Hyperplasie mit Beeinträchtigung der Erythrocyto- und Granulocytopoese. Eine Eosinophilie sprach gegen eine Systemerkrankung und für ein reaktives Verhalten.
Das Blutbild wies zur Zeit der Punktion folgende Werte auf:

Leuco	:	12800/mm^3
Bas	:	1
Eo	:	1
Meta	:	1
St	:	28
Seg	:	33
Lym	:	28
Mono	:	8

1 LE-Zelle auf 1000 Zellen

Ery	:	4.14 Mill/mm^3
Hb	:	11.8 g%
Hb_E	:	28.7 "

Das Leucocytoseplasma wurde von einem nicht antibiotisch behandelten Patienten mit LWS-Metastasen bei Prostatacarcinom und Herzinsuffizienz gewonnen. Sein Blutbild war bei 17 200 Leucocyten pro mm^3 linksverschoben.

Die Kulturauszählung ergab bei mässig bis schlecht erhaltenen Zellen folgendes:
Das Ausgangspräparat zeigte wie bei Fall 1 eine Vermehrung der teilungsfähigen und eine Verminderung der nicht mehr teilungsfähigen weißen Knochenmarkzellen. Zu beiden genannten Zeiten reiften die Myeloblasten und Promyelocyten auf Leucocytoseplasma stärker aus, die Myelocyten dagegen erschienen in ihrer Ausreifung gehemmt.
In der roten Reihe trat im Originalpräparat eine Vermehrung der basophilen und reifen Erythroblasten auf. Die Versuchskulturen reiften hier stärker aus als die Kontrollen.
Auch hier zeigten zwar die Zellveränderungen, nicht aber die Mitoseveränderungen Signifikanz.

	Original	24 h Kont.	24 h Vers.	48 h Kont.	48 h Vers.
Granulopoese					
MI in ‰	14	4.6	5.2	5.6	5.1
Mitosen	13	3	3	3	3
teil.f.Z.	955	669	576	532	585
Erythropoese					
MI in ‰	28.5	30.5	ø	ø	ø
Mitosen	10	4	ø	ø	ø
teil.f.Z.	351	131	4	6	ø
G/E-Index	2.69	2.54	6.60	3.84	4.79

Der G/E-Index ist in den Versuchskulturen gegenüber den Kontrollen erhöht.

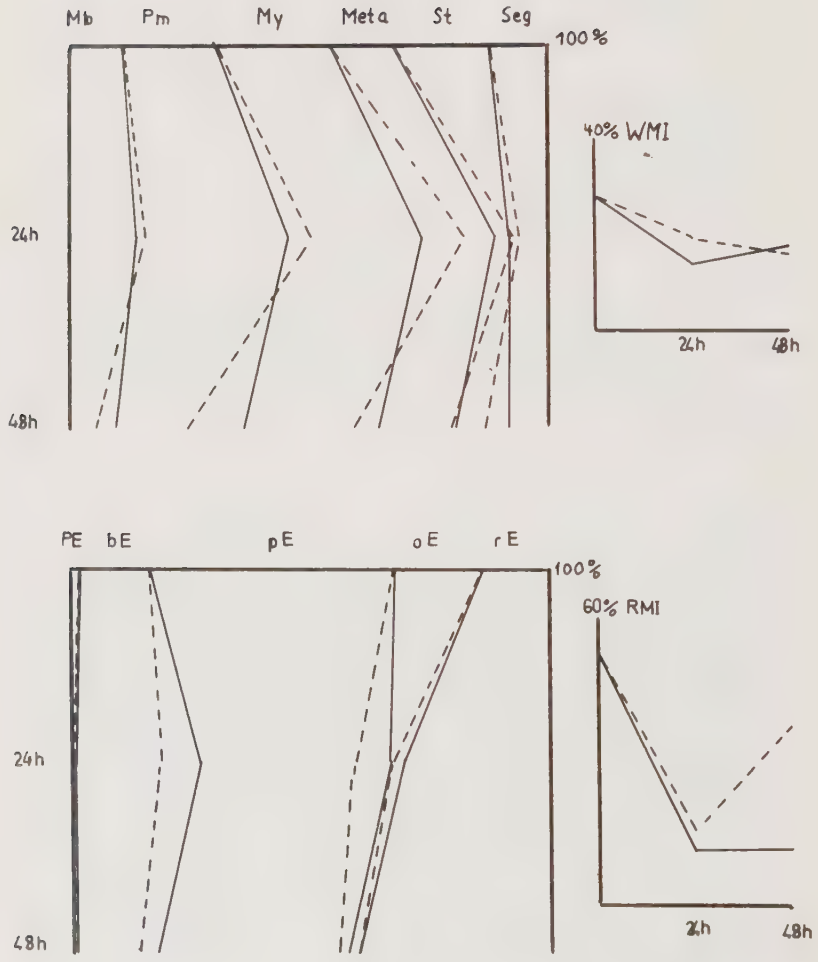
Fall 3 (Abb. 5 und 6)

Emma B., 66 Jahre, wurde wegen Verdachts auf Aortenaneurysma in die Klinik aufgenommen. Die kymographische Untersuchung sicherte die Verdachtsdiagnose. Die Patientin erhielt keine Antibiotica. Zum Ausschluß einer Systemerkrankung wurde sie sternalpunktiert. Die Myeloblastenvermehrung ließ zwar an eine Systemerkrankung denken, bewies sie aber nicht. Eine Reticulum- und Plasmazellvermehrung sprachen eher für einen chronischen Infekt.
Das Blutbild zur Zeit der Punktion ergab folgendes:

Leuco	:	7300/mm^3
Bas	:	1
Eo	:	1
St	:	10
Seg	:	47
Lym	:	38
Mono	:	3

Ery	:	4.98 Mill/mm^3
Hb	:	15.5 g%
Hb_E	:	31 "

FALL 3



– – – Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Abb. : 56

Das **Leucocytoseplasma** spendete ein Patient mit Cystopyelitis, der 18400 Leucocyten pro mm^3 hatte. Sein Differenzialblutbild war stark linksverschoben. Es wurden ihm Antibiotica verabreicht.

Bei der Kulturauszählung fiel im Original eine geringe Verminderung der reifen zugunsten der unreifen weißen Zellen auf. In der 24-Stunden-Kultur vermehrten sich die teilungsfähigen Vorstufen signifikant nach Zusatz von Plasma des Patienten mit Cystopyelitis, und in der 48-Stunden-Kultur war eine signifikant verstärkte Ausreifung festzustellen.
Der Originalausstrich wies in der roten Reihe eine Rechtsverschiebung auf. In der Zusatzkultur sah man zu beiden Zeiten eine etwas verstärkte Ausreifung, die aber ebenso wie die Mitoseänderungen keine Signifikanz aufwies.

	Original	24 h		48 h	
		Kont.	Vers.	Kont.	Vers.
Granulopoese					
MI in ‰	27.6	13.8	19.6	17.6	15.5
Mitosen	24	16	23	17	15
teil.f.Z.	869	1158	1178	969	966
Erythropoese					
MI in ‰	52.4	11.7	15.8	13.3	38.6
Mitosen	19	3	5	3	11
teil.f.Z.	363	256	317	228	285
G/E-Index	3.12	3.60	2.72	3.09	2.56

Der G/E-Index war im Ausgangspräparat normal und in der Kultur nur wenig verändert.

Fall 4 (Abb. 7 und 8)

Johanna M., 66 Jahre, wurde wegen digitalisresistenter Tachycardie, Decubitalgeschwüren und starkem Meteorismus ins Krankenhaus eingewiesen. Puls und Temperatur waren erhöht. Antibiotica blieben ohne Effekt. Die Patientin verstarb später, nach dem Sektionsbefund an akuter Lungenembolie und Pancreasnecrose. Die Sternalpunktion schloß eine Systemerkrankung aus. Die Plasmazell-, Reticulumzell- und Promyelocytanvermehrung sowie die Eosinophilie deuteten auf eine chronische Infektion.
Das Blutbild betrug zur Zeit der Punktion:

Leuco	:	8100/mm^3
Bas	:	2
Eo	:	1
St	:	7
Seg	:	65
Lym	:	22
Mono	:	3

Das Leucocytoseplasma wurde einem Patienten mit Herzspitzenreinfarkt entnommen. Bei einer Linksverschiebung im weißen Differenzialblutbild lagen seine Leucocytenwerte bei 18100 pro mm^3. Er wurde antibiotisch behandelt.

Bei der Kulturauszählung ergab sich folgendes:
Im Originalausstrich fand sich eine nahezu normale Zellverteilung in der weißen Reihe. Die 24-, 48- und 72-Stunden-Kulturen reiften im Versuch signifikant stärker aus als in den Kontrollen.
Ebenso verhielt sich die rote Reihe. Nur die 24-Stunden-Kultur in der roten Reihe mußte wegen zu geringer Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle vernachlässigt werden.
Die Mitoseveränderungen zeigten keine Signifikanz.

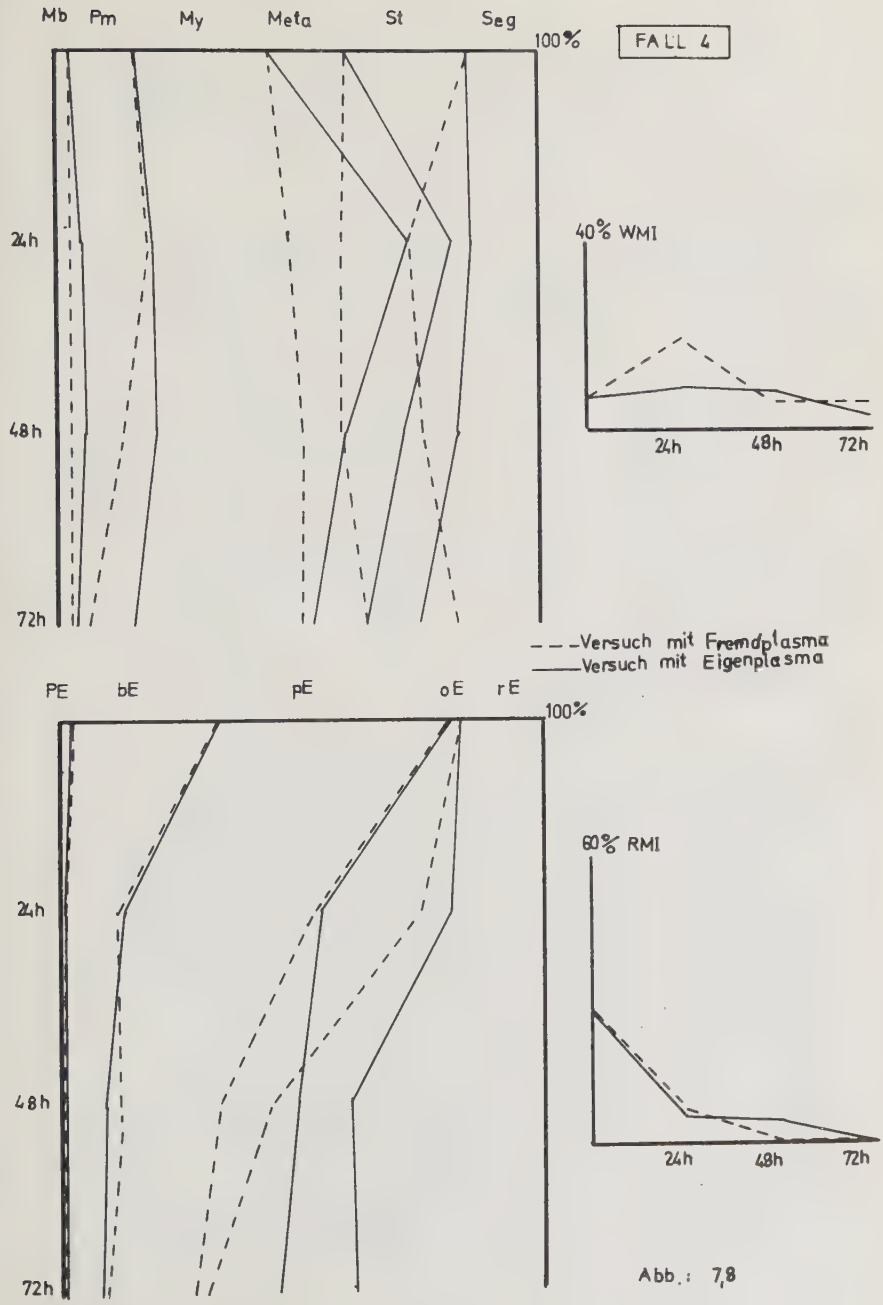

Mb
Pm
My
Meta
St
Seg
100%
FALL 4
24h
48h
72h
40% WMI
24h
48h
72h
---Versuch mit Fremdplasma
——Versuch mit Eigenplasma
PE
bE
pE
oE
rE
100%
24h
48h
72h
60% RMI
24h
48h
72h

Abb.: 7,8

	Original	24 h Kont.	24 h Vers.	48 h Kont.	48 h Vers.	72 h Kont.	72 h Vers.
Granulopoese MI in ‰	6.5	8.7	18.9	8.0	5.8	3.8	5.8
Mitosen	6	8	16	7	5	3	4
teil.f.Z.	931	915	843	871	865	800	696
Erythropoese MI in ‰	27.6	5.9	7.2	4.5	ø	ø	ø
Mitosen	4	2	2	1	ø	ø	ø
teil.f.Z.	145	336	278	223	110	166	160
G/E-Index	10.7	2.73	3.82	5.28	5.87	4.73	2.01

Der G/E-Index war im Original stark zugunsten der Granulopoese verschoben, in der Kultur aber nur unauffällig.

In den folgenden Fällen wurde nur die weiße Reihe ausgewählt.

Fall 5 (Abb. 9 und 10)

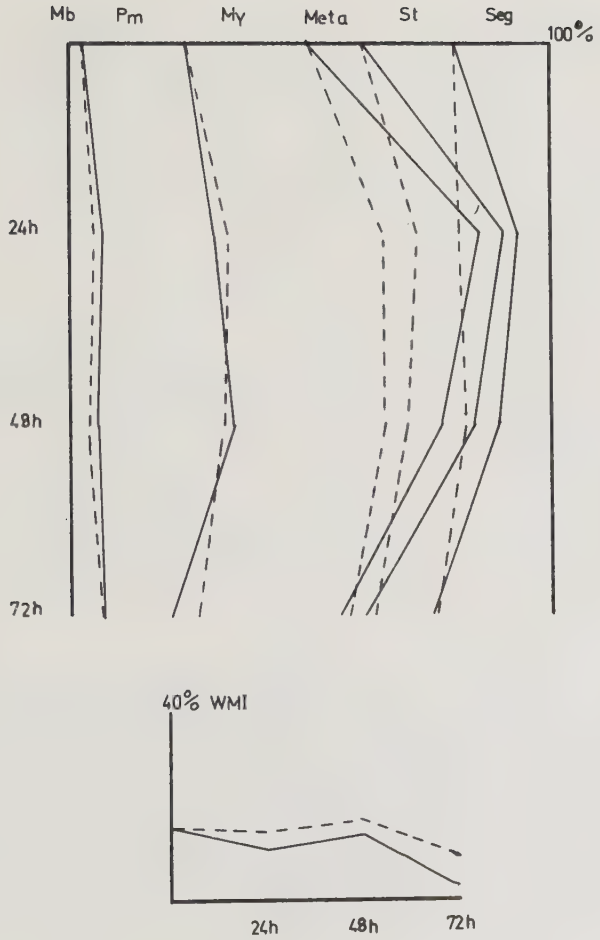
Franz G., 81 Jahre, wurde wegen einer dekompensierten Lebercirrhose behandelt. Eine Pleurapunktion erbrachte einen erythrocytär-mesothelialen Erguß, der atypische Zellen aufwies. Antibiotica wurden nicht verabfolgt. Um den Tumorverdacht zu klären, wurde der Patient sternalpunktiert. Es fanden sich keine Tumorzellen. Lediglich eine Plasmazellvermehrung konnte als indirektes Tumorzeichen gewertet werden.

Das Blutbild zur Zeit der Punktion:

Leuco	:	5300/mm^3
Eo	:	1
Bas	:	1
St	:	6
Seg	:	53
Lym	:	31
Mono	:	8

Ery	:	4.00 Mill/mm^3
Hb	:	12.4 g%
Hb_E	:	31 "

FALL 5



– – – Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Abb.: 9,10

Das Leucocytoseplasma war einem nicht antibiotisch behandelten Patienten mit Lymphosarkom, der 14200 Leucocyten pro mm^3 aufwies, entnommen. Sein Differenzialblutbild zeigte keine Linksverschiebung.

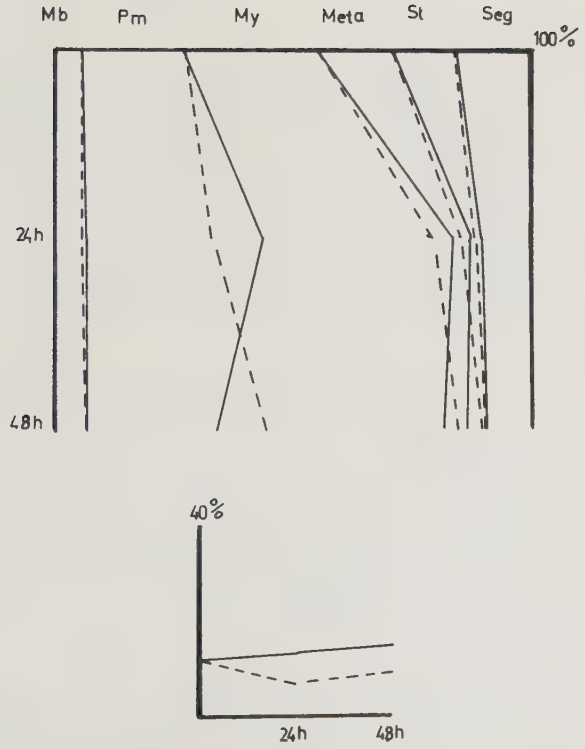
Die Kulturauszählung erbrachte folgende Ergebnisse:
Die aus dem Originalausstrich ermittelten Ausgangswerte ergaben eine geringgradige Linksverschiebung in der Granulopoese. In den 24- und 48-Stunden-Versuchskulturen reiften die Zellen signifikant stärker aus als die der Kontrollen. Die geringen Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle in der 72-Stunden-Kultur waren wegen einer Irrtumswahrscheinlichkeit, die größer als 1 % war, nicht zu verwerten.
Die Mitoseänderungen waren nicht signifikant.

	Original	24 h		48 h		72 h	
		Kont.	Vers.	Kont.	Vers.	Kont.	Vers.
Granulopoese MI in ‰	14.8	11.2	15.3	14.4	17.2	3.3	9.5
Mitosen	9	10	11	12	12	2	3
teil.f.Z.	610	890	719	836	697	611	315

Fall 6 (Abb. 11 und 12)

Walter U., 55 Jahre, suchte wegen krampfartiger Schmerzen im rechten Oberbauch mit Fieber und braungefärbtem Urin das Krankenhaus auf. Es handelte sich um eine akute Cholecystitis bei wahrscheinlicher Cholelithiasis. Nach Gabe von Antibiotica und Atropin besserte sich der Zustand bald. Um ein fragliches Plasmocytom auszuschließen, wurde er sternalpunktiert. Bis auf eine gering linksverschobene Granulopoese war das Knochenmark jedoch ohne krankhaften Befund.

FALL 6



– – – Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Abb.: 11,12

Das Blutbild zur Zeit der Punktion:

Leuco	:	12100/mm^3
Eo	:	2
St	:	3
Seg	:	70
Lym	:	23
Mono	:	2

Ery	:	5.18 Mill/mm^3
Hb	:	17.0 g%
Hb_E	:	33 "

Das normale Fremdplasma stammte von einem Patienten mit 7000 Leucocyten pro mm^3.

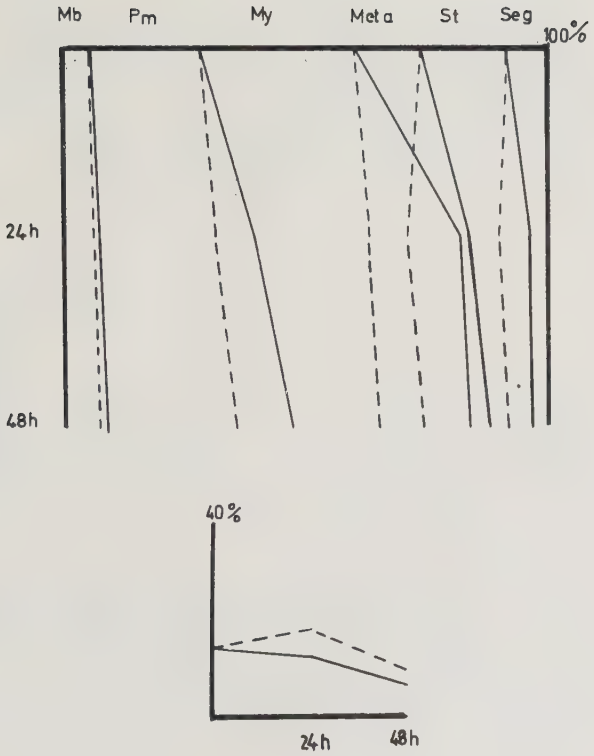
Die Ergebnisse der Kulturauszählung waren folgende:
Im Originalpräparat fand sich eine Myeloblasten-, Promyelocyten- und Myelocytenvermehrung und die reifen Granulocyten waren vermindert, d.h. es war eine Linksverschiebung vorhanden. Die nicht signifikant stärkere Ausreifung auf Zusatz von nicht leucocytotischem Fremdplasma in der 24-Stunden-Versuchskultur wandelte sich bei 48 Stunden in eine signifikant verlangsamte Ausreifung um.
Die Mitoseveränderungen waren nicht signifikant.

	Original	24 h		48 h	
		Kont.	Vers.	Kont.	Vers.
Granulopoese MI in ‰	11.9	12.6	7.1	15.1	9.0
Mitosen	17	11	3	13	8
teil.f.Z.	1431	872	426	859	889

Fall 7 (Abb. 13 und 14)

Martha H., 75 Jahre, wurde mit einer schon früher diagnostizierten, mit Vitamin B_{12} behandelten perniciösen Anaemie mit starken voluminösen Durchfällen und Spontanfrakturen an Rippen und Extremitäten ins Krankenhaus verlegt. Eiweißverminderung und Elektrolytstörungen führten zu einer feuchten Dekompensation. Als Ursache wurde eine

FALL 7



— — — Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Abb.: 13/14

einheimische Sprue oder vielleicht auch eine chronische Pancreatitis angenommen. Die nach der Sternalpunktion durchgeführte Corticoidtherapie verschlechterte plötzlich den Zustand der Patientin und sie starb an Kreislaufversagen. Der Pathologe stellte ein klinisch nicht diagnostiziertes Pleuraempyem fest, das wahrscheinlich erst unter der Corticoidtherapie entstanden war. Antibiotica wurden nicht verabreicht. Die Sternalpunktion zeigte in der roten Reihe eine Erythroblastenvermehrung. Die Granulopoese war linksverschoben, und die lymphoiden Reticulumzellen waren vermehrt.
Das Blutbild zur Zeit der Sternalpunktion und noch vor der Prednisonbehandlung:

Leuco	:	9400/mm^3
Eo	:	1
St	:	27
Seg	:	31
Lym	:	34
Mono	:	7

Ery	:	4.14 Mill/mm^3
Hb	:	13.5 g%
Hb_E	:	32 "

Das **Leucocytoseplasma** wurde einem Patienten mit Pyelonephritis entnommen, dessen Leucocyten 15200 pro mm^3 betrugen und der unter antibiotischer Behandlung stand. Sein Blutbild war linksverschoben.

Bei der Kulturauszählung waren die Myeloblasten, Promyelocyten und Myelocyten vermehrt, die reifen weißen Zellen dagegen vermindert. Die 24- und 48-stündigen Versuchskulturen reiften gegenüber den Kontrollkulturen signifikant stärker aus.
Die Änderung in der Mitosehäufigkeit ergab keine signifikanten Werte.

	Original	24 h		48 h	
		Kont.	Vers.	Kont.	Vers.
Granulopoese MI in ‰	14.2	12.2	17.4	5.7	8.8
Mitosen	21	9	25	5	13
teil.f.Z.	1474	738	1435	882	1478

Fall 8 (Abb. 15 und 16)

Friedrich N., 65 Jahre, wurde mit Schmerzen im Oberbauch, mit Gewichtsabfall, Hepatosplenomegalie und einem für chronisch-myeloische Leukämie typischen Blutbild ins Krankenhaus eingewiesen. Der Patient erhielt keine Antibiotica und wurde erst nach der Sternalpunktion mit Myleran behandelt. Das Sternalpunktat bestätigte die chronisch-myeloische Leukämie. Die weiße Reihe war in allen Reifestufen reichlich vertreten, Promyelocyten und Megacaryocyten waren vermehrt und die Erythropoese vermindert. Es wurde der Verdacht geäußert, daß ein Übergang in eine Megacaryocytenleukämie möglich sei.
Das Blutbild zur Zeit der Punktion:

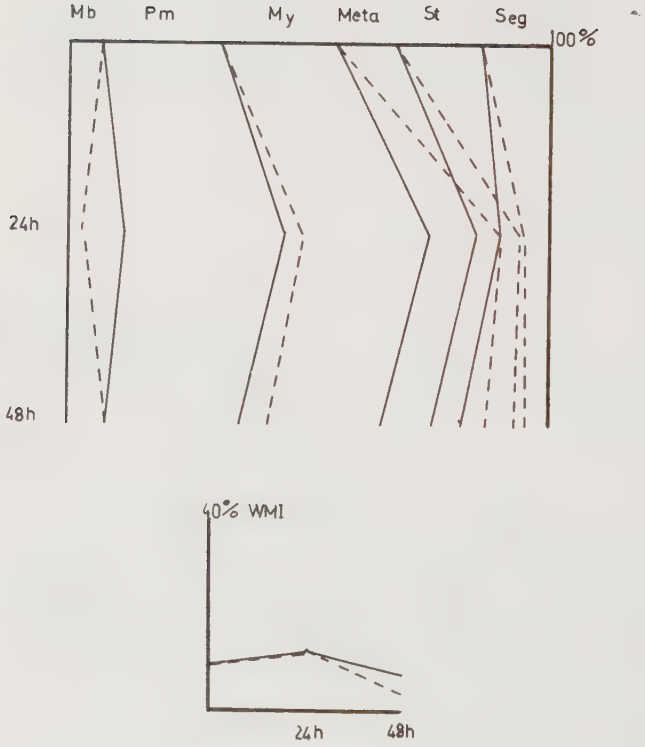
Leuco	:	110 000/mm^3
Bas	:	6
Eo	:	3
Mb	:	6
Pm	:	16
My	:	9
Meta	:	13
St	:	21
Seg	:	23
Lym	:	2
Mono	:	1

Ery	:	3.80 Mill/mm^3
Hb	:	10.9 g%
Hb_E	:	28.6 "

Das normale Fremdplasma lieferte ein Patient, dessen Leucocytenzahl 8000 pro mm^3 betrug.

In den Kulturen vermehrten sich mit dem nicht leucocytotischen Fremdplasma die teilungsfähigen Vorstufen nach 24 h stärker und fielen nach 48 h kaum ab. Die Abweichungen waren signifikant.
Signifikante Mitoseveränderungen traten nicht auf.

FALL 8



--- Versuch mit Fremdplasma
—— Versuch mit Eigenplasma

Abb. : 15,16

	Original	24 h Kont.	24 h Vers.	48 h Kont.	48 h Vers.
Granulopoese MI in ‰	11.0	11.7	11.8	7.9	4.3
Mitosen	15	20	11	12	2
teil.f.Z.	1365	1704	939	1528	465

Fall 9 (Abb. 17 und 18)

Hans S., 37 Jahre, wurde mit einer schon länger bekannten chronisch-myeloischen Leucämie mit der Fragestellung eines akuten Schubes ins Krankenhaus eingewiesen. Er fühlte sich matt, schwindelig und hatte Gliederschmerzen. Unter Myleran und Ultracorten senkte sich die Leucocytenzahl. Der Patient konnte dann mit normaler Leucocytenzahl und mäßiger Myeloblastenausschüttung entlassen werden. Er wurde nicht mit Antibiotica behandelt. Die Sternalpunktion, noch vor der Myleranbehandlung durchgeführt, konnte den vermuteten akuten Schub nicht bestätigen.
Das Knochenmark bestand vorwiegend aus Zellen der weißen Reihe, doch waren alle Reifestufen bei mäßiger Linksverschiebung vorhanden. Die Eosinophilen waren deutlich vermehrt, Ery- und Thrombopoese relativ gut vertreten.
Das Blutbild zur Zeit der Punktion:

Leuco	:	96 000/mm^3
Bas	:	6
Eo	:	5
Mb	:	6
Pm	:	18
My	:	12
Meta	:	16
St	:	12
Seg	:	24
Lym	:	1

Ery	:	4.46 Mill/mm^3
Hb	:	13.6 g%
Hb_E	:	30 "

FALL 9

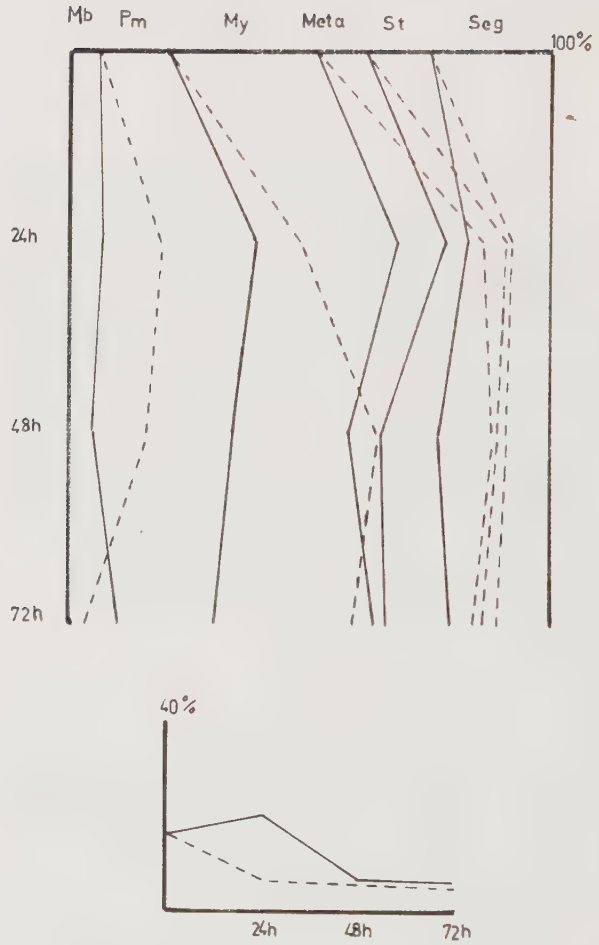


Abb.: 17,18

– – – Versuch mit Fremdplasma
——— Versuch mit Eigenplasma

Das normale Fremdplasma stammte von einem Patienten mit Osteomyelofibrose, dessen Leucocyten bei mäßig starker Linksverschiebung 8600 pro mm^3 betrugen. Er erhielt keine Antibiotica.

Bei der Auswertung der Kulturen zeigte sich folgendes: Im Originalpräparat waren die teilungsfähigen gegenüber den nicht mehr teilungsfähigen weißen Knochenmarkzellen vermehrt. Im Versuch reiften die Zellen zu allen Zeiten signifikant langsamer aus als mit Eigenplasma. Der Mitoseindex war unter Normalplasma geringfügig, aber nicht signifikant erniedrigt.

	Original	24 h		48 h		72 h	
		Kont.	Vers.	Kont.	Vers.	Kont.	Vers.
Granulopoese							
MI in ‰	16.1	20.4	6.5	7.7	5.6	6.1	4.6
Mitosen	10	16	6	5	5	2	4
teil.f.Z.	622	785	907	651	894	330	866

Betrachtet man die karyologische Kurve der Granulopoese der Versuche 1 - 7 insgesamt (Abb. 19), so zeigt sich in der frühen Metaphase deutlich eine Vermehrung in den Versuchs- gegenüber den Kontrollkulturen.

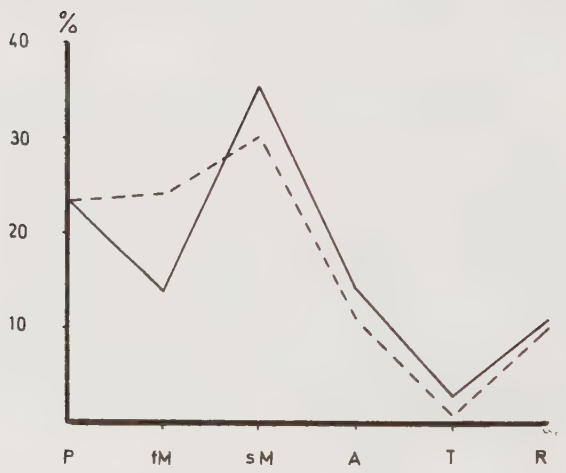
IV. Diskussion der verschiedenen Kombinationen der neun durchgeführten Versuche mit aus der Literatur bekannten Hypothesen und Fakten

Die neun Versuche wurden in verschiedenen Kombinationen durchgeführt:

a) Knochenmark mit etwa normaler Granulopoese wurde mit eigenem Plasma und fremdem Leucocytose-Plasma kultiviert (Versuche 3, 4, 5)

b) Knochenmark mit angeregter Granulopoese wurde mit eigenem Plasma und fremdem Normalplasma kultiviert (Versuch 6)

KARYOLOGISCHE KURVE (FALL 1-7)



– – – Versuch mit Fremdplasma (159 Mitosen)
——— Versuch mit Eigenplasma (119 Mitosen)

Abb. : 19

c) Knochenmark mit angeregter Granulopoese wurde mit eigenem Plasma und fremdem Leucocytose-Plasma kultiviert (Versuche 1, 7)

d) Knochenmark bei Lupus erythematodes visceralis wurde mit eigenem und Leucocytose-Plasma kultiviert (Versuch 2)

e) Knochenmark bei chronisch-myeloischer Leukämie wurde mit eigenem Plasma und Normal-Plasma kultiviert (Versuche 8, 9).

1. Reaktion von normalem und in der Granulopoese angeregtem Knochenmark auf Leucocytoseplasma

Ad a) In den Versuchen 3, 4 und 5, bei denen normales Knochenmark mit Leucocytoseplasma kultiviert wurde, ergab sich in vitro eine signifikante Reifungsförderung in der Granulopoese, während die Erythropoese in zweien der drei Versuche nur wenig verändert war. Nach 24 h war der Mitoseindex bei allen drei Versuchen erhöht, was nach BOLL für eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten, damit auch für eine Reifungsförderung spricht.

Ad b) Das angeregte Knochenmark von Fall 6, das mit normalem Fremdplasma kultiviert wurde, zeigte dadurch keine Änderung seiner Reifungskurve. Der Mitoseindex war nach 24 h nicht erhöht, sondern erniedrigt.

Ad c) Bei den beiden Fällen 1 und 7 mit angeregtem Knochenmark, die mit Leucocytose-Plasma kultiviert wurden, ergab sich eine geringe bzw. gute Reifungsförderung und in beiden Fällen eine Mitosevermehrung durch das Fremdplasma.

Die Reifungskurven normalen und in der Granulopoese angeregten Knochenmarkes (Ad a, b, c), das im eigenen Plasma kultiviert wurde, unterscheiden sich nach BOLL bis 24 h nicht; erst später tritt bei angeregtem Knochenmark eine leichte Reifungsförderung in Erscheinung. BOLL stellte in acht früher untersuchten Fällen bei angeregtem Knochenmark gegenüber normalem eine Verminderung des Mitoseindex fest. Die hier beschriebenen Versuche, in denen eigenes Plasma mit fast normalem Knochenmark kultiviert wurde (Fälle 3, 4, 5), sind damit vergleichbar und entsprechen zum Teil diesen Reifungskurven. Die Fälle mit angeregter Granulopoese (1, 2, 6 und 7) zeigen eine stärker links-verschobene Reifungskurve.

Durch Zusatz von Normalplasma (Versuch 6) ergab sich keine Änderung der Reifungskurve, wie zu erwarten war. Der erniedrigte Mitoseindex ist im Sinne einer gewissen Reifungsminderung zu werten.

Durch Zusatz von Leucocytoseplasma (Versuche 1, 3, 4, 5 und 7) wurde die Reifung in allen Fällen signifikant gefördert. Die Mitoseindices waren nach 24 h erhöht, was ebenfalls für eine Reifungsförderung spricht.

STEINBERG stellte auf Grund seiner Versuchsergebnisse die Hypothese auf, daß jede Zellreihe - und so auch die weiße Reihe - von einem Paar von Regulatoren beeinflußt wird. Der eine Teil davon ist verantwortlich für Regeneration und Reifung (Granulocytopoesin), der andere hält beides auf einem physiologischen Niveau (Granulocytopenin). Eine Serumalbuminfraktion, die STEINBERG bei ständig fließender Elektrophorese und nach Behandlung mit Natriumtetrametaphosphat gewonnen hatte, vergrößerte bei Kaninchen die Produktion und Reifung sowohl der Granulocyten als auch der Erythrocyten. Vermutlich ist im Leucocytoseplasma das Granulocytopoesin vermehrt. Entweder besteht die Vermehrung dieses Faktors in einer absoluten Anhäufung des

Granulocytopoesins, oder der hemmende Faktor, das Granulocytopenin, fällt weg, so daß bei gleicher Menge von Granulocytopoesin eine relative Verstärkung resultiert. Die Versuche von GIDALI und FEHER über die Wirkung von leucocytotischem und leucopenischem Kaninchenserum auf normales Kaninchenknochenmark bestätigten das Vorhandensein von die Granulopoese stimulierenden Faktoren. Nach ihrer Meinung existiert im leucocytotischen Serum ein Faktor, der erst die Teilung und dann die Reifung steigert. Mit unserer Versuchsanordnung konnte am menschlichen Knochenmark in vitro der reifungsfördernde Faktor im Leucocytoseplasma bestätigt werden.

Die Patienten der Versuche 1, 3 und 6 wurden vor der Sternalpunktion und Blutentnahme mit Antibiotica behandelt. Bei Fall 1 und 6 fanden sich daher Antibiotica im eigenen , bei Fall 3 im Fremdplasma. Diese Fälle zeigen die geringeren Abweichungen zwischen Versuchs- und Kontrollkultur. Ob die Antibiotica einen Einfluß auf dieses Ergebnis hatten, bleibt fraglich.

Ad d) Knochenmark bei Lupus erythematodes visceralis (Fall 2) ist unseres Wissens bisher noch nicht in vitro untersucht worden. In Abweichung von den üblichen Reifungskurven kam es nach 24 h bei dem Kontrollansatz zu einer Vermehrung der segmentkernigen Granulocyten, später zu ihrer Verminderung. Im Versuch mit Leucocytoseplasma bildeten sich die Veränderungen nach 24 h zurück.

Eine Stellungnahme ist bei diesem Einzelfall nicht möglich, zumal der Patient unter Corticoideinwirkung stand.

2. Reaktion von myeloischem Knochenmark auf Normalplasma

Ad e) Bei beiden chronischen Myelosen (Fall 8, 9) wurde durch das fremde Normalplasma die Reifung stark

behindert und der Mitoseindex nicht erhöht.

Beide Fälle von chronisch-myeloischer Leukämie zeigten auf Eigenplasma hin nach 48 h eine Beeinträchtigung der Reifung wie sie von BOLL beschrieben wurde. Danach geht die chronische Myelose mit einer verminderten Regeneration und Reifung einher. Bei Zusatz von Normalplasma nimmt in unseren Versuchen die Reifung und Regeneration weiter ab. Aus diesem Ergebnis muß man schließen, daß das Fremdplasma weniger reifungsfördernde Substanzen enthält als das der chronisch-myeloischen Leukämie. Allerdings war das eine der normalen Fremdplasmen (Versuch 9) von einem Patienten mit einer Osteomyelofibrose.

Wir müssen also annehmen, daß das Serum der Patienten mit chronischer Myelose im Vergleich mit dem Normalserum mehr proliferationsanregende Stoffe enthält. Die Reaktionsfähigkeit der Granulopoese bei chronischer Myelose ist danach in gewissem Maße noch erhalten.

Zwei von BOLL untersuchte Fälle mit chronisch-myeloischer Leukämie bei Infektion reiften stärker aus als solche ohne Infektion. Ein gegenüber Normalplasma vermehrt vorhandener reifungsfördernder Faktor im leukämischen Plasma ist daher auch schon ohne zusätzliche Infektion denkbar. Er müßte aber nicht nur am myeloischen Knochenmark angreifen, sondern auch das normale Knochenmark verändern. Versuche, bei denen normales Knochenmark mit Serum von chronisch-myeloischen Patienten kultiviert wurde, führte REISNER jun. durch und fand eine Stimulation des Knochenmarkes. Die Ergebnisse von PLUM und CLEMMESEN beziehen sich nur auf die Gesamtzellzahlen in Flüssigkeitskulturen während sechs Stunden. Eine Aussage über die Proliferation der Granulopoese durch Zusatz von Normalplasma kann auf Grund der Gesamtzellzahlvermehrung nicht getroffen werden.

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt unter Verwendung der Koagulumkultur die Wirkung von Fremdplasma auf menschliches Knochenmark in vitro. Nach 24, 48 und 72 h angefertigte, nach PAPPENHEIM gefärbte Ausstriche wurden differenziert und außerdem Mitosen gezählt.

Normalplasma blieb auf die angeregte Granulopoese ohne Einfluß. Leucocytoseplasma zu etwa normalem Knochenmark zugesetzt, erbrachte in drei Fällen eine Reifungsförderung. Auch in der Granulopoese angeregtes Knochenmark zeigte in zwei Fällen bei Zusatz von leucocytotischem Fremdplasma eine verstärkte Ausreifung. Ein reifungsfördernder Faktor im Leucocytoseplasma läßt sich mit unserer Versuchsanordnung, also am menschlichen Knochenmark in vitro, bestätigen.

Normalplasma zu Knochenmark von chronisch-myeloischer Leukämie gegeben, erbrachte in zwei Fällen eine verstärkte Reifungshemmung gegenüber dem Zusatz von Eigenplasma. Dieses Ergebnis wird im einzelnen diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

BIERMAN, H.R. : Characteristic of Leukopoetin G in Animal and Man.
Ann. N.Y. Acad. Sci.
113:753
(1964)

----, BOGGS, D.R.
I.W.ATHENS
G.E.CARTWRIGTH a.
M.M. WINTROBE : Masked Granulocytosis
Soc. Exp. Biol. Med.
118, 753:755
(1965)

----, C.H. KELLY
R.L. BYRON a.
G.J. MARSHALL : Leucapheresis in Man. I. Haematological Observations Following Leucocyte withdrawal in Patients with Nonhaematological Disorders.
Brit. J. Haemat. VII. 1:51
(1961)

----, K.H. KELLY a.
F.L. CORDES : The Sequestration and visceral Circulation of Leucocytes in Man.
Ann. N.Y. Acad. Sci.
59:850
(1955)

----, K.H. KELLY
G.J. MARSHALL
M.A. BALUDA a.
F.L. CORDES : The Production and Destruction of Granulocytes in Normal and Leukemic Man.
Ann. N.Y. Acad. Sci.
77:417
(1959)

----, G.J. MARSHALL
K.H. KELLY a.
R.L. BYRON : Leucapheresis in Man. II. Changes in Circulating Granulocytes, Lymphocytes and Platelets in the Blood.
Brit. J. Haemat. S. 1:77
(1962)

----, G.J. MARSHALL
K.H. KELLY a.
R.L. BYRON : Leucocyte Production and Delivery in the Leukemias of Man.
J. Clin. Invest. 35:691
(1956)

----, G.J. MARSHALL K.H. KELLY a. R.L. BYRON	:	Leucapheresis in Man. III. Haematologic Observation in Patients with Leukemia and Myeloid Metaplasia. Blood 21:164 (1963)
BOLL, I.	:	Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Bln.Heid.-New York, Springer 1966
----,	:	The Maturation of Normal Granulocytopoiesis in Vitro Compared with that of Chronic Myelocytic Leukemia. Sangre 9:41 (1964)
CALVO, W.	:	Nervous Regulatory Mechanism in Adeption Haematology. Euratom Contact Group Meeting Hinterzarten 1966
CLEMMESEN, J. a. C.M. PLUM	:	A Simplified Method for in Vitro Examination of the Erythropoiesis of Bone Marrow Applied to Cases of Pernicious Anemia and Leukosis. Act. Physiol. Scandinav. Vol. 25 Fasc. 2-3 (1952)
CRONKITE, E.P. a. G. BRECHER	:	The Protective Effect of Granulocytes in Radiation Injury. Ann.N.Y.Ac.Sci. 59:815 (1955)
FIESCHI, A. e C. SACCHETTI	:	La Cultura in vitro del midollo osseo: Applicioni di interesse clinico. Minerva Med. 50,4267 (1959)
----,	:	La Riserva midollare di granulociti neutrofili. Min. nuc. 8,324 (1964)

GIDALI, J., I.FEHER : Myelopoesis Controlling Agents in Vitro. Amer. J. Physiol. 206, 1964

GORDON, A.S. : Humoral Regulation of Leucocyte Numbers. Trans. N.Y. Acad. Sci. 23, 39 (1960)

----, E.S. HANDLER, C.D. SIEGEL, B.S. DORNFEST a. I. Lobue : Plasma Factors Influence Leucocyte Release in Rats. Ann.N.Y. Acad. Sci. 113, 2:766 (1964)

----, R.O. NERI, CH.D.SIEGEL, B.S. DORNFEST, E.A. HANDLER, I.LOBUE a.M. EISLER : Evidence for a Circulating Leucocytosis-Inducing Factor (LIF). Acta Haemat. 23, 323 (1960)

KOMIYA, E. : Weitere Beiträge über die neurohumorale Regulation des Blutbildes. Fol. haemat. 3, 46 (1958)

----, G. SHIBAMOTO, N. NODA, T. SUGOMOTO, S. SATO, K. HOSHI a. N. KAWASHIMO : Extraktion der neurohumoralen blutregulierenden Wirkstoffe. Fol. haemat. 3, 374 (1959)

LINDER, A. : Statistische Methoden. Basel-Stuttgart, Birkhäuser Verlag, 1960

LINMANN, J.W. : Faktoren zur Regulation der Haematopoese: thrombopoetische und leucopoetische Wirkung eines "anaemischen" Plasmas. J. Lab. chir. Med. 59:262 (1962)

MENKIN, V. : Factors Concerned in the Mobilization of Leucocytes in Inflammation. Ann.N.Y. Acad. Sci. 59/956 (1955)

MÜLLER, E.F. : Leucocytose und Leucopenie.
Aus Hdb. allg. Hämat.
Bd. I
2. Hälfte 736-894,
Berlin-Wien, Urban und Schwarzenberg
1933

PLUM, C.M. a. J. CLEMMESEN : In Vitro Study of Bone Marrow V. Erythropoiesis of Bone Marrow from Cases of Pernicious Anemia and Leukosis.
Act. Med. Scandinav.Vol. CXLIII,
fasc. IV
1952

REISNER, E.H. : Markstimulierende Effekte von Seren von Patienten mit markproliferierenden Krankheiten in Markkulturen.
X. Internat. Haemat. Kongr.
Stockholm
1964

STEINBERG, B., F.H.F. CHENG a. R.A. MARTIN : Factors in Normal Human Serum Affecting Proliferation and Maturation of Erythrocytes and Granulocytes.
Acta Haemat. 33,86
(1965)

----, : Mechanism of Haematopoesis Haematopoetic Effects of Serum Albumin
Arch. Path. 67, 489
(1959)

----, A.A. DIETZ a. A. ATAMER : Mechanism of Haematopoesis Haematopoetic Regulators in Serum Albumin.
Arch. Path. 67, 496
(1959)

STORER, J.B., P. SANDERS a. C.C. LUSHBAUGH : Effect of Leucocyte Promoting Factor (LPF) on Survival of x-Irradiated Mice.
Proc.soc.Exp.Biol.Med.
81:541
(1952)

TEIR, H.T. RYTÖMAA	:	A Feedback Regulation System of Granulocytopoesis. Sangre 9, 418, 1964
WENDT, F.	:	Neue Ergebnisse der Pyrogenforschung. Dtsch.med.Wschr., 46,2084-2089 (1959)
----,	:	Untersuchungen über die Pathogenese des Fiebers beim Menschen: Über die Bedingungen, unter denen in Leucocytensuspensionen secundäres, endogenes Pyrogen gebildet wird. Verh.dtsch.Ges.inn.Med., 67. Kongr. 1961
----,	:	Über die Pathogenese des Fiebers: Weitere Untersuchungen zur Entstehungsweise des secundären endogenen Pyrogens beim Menschen. Verh.dtsch.Ges.inn.Med., 68. Kongr. 1962
----, u. I.Y. KIM	:	Über die Pathogenese des Fiebers beim Menschen: Verhalten der zirkulierenden neutrophilen Granulocyten nach Injektion von bakteriellem Endotoxin und endogenem Pyrogen. Ztschr.ges.exp.Med. 131, 246-254 (1959)
WOOD, W.B.	:	Die Pathogenese des Fiebers. Med. Prisma 3, 1966

VII. Lebenslauf

3. 5. 1937	Als Tochter des Textilkaufmannes Heinrich Boxheimer und seiner Ehefrau Anni, geb. Sonnemann, in Berlin geboren
1943 - 1948	Volksschulbesuch
1948 - 1955	Besuch des Berlinischen Gymnasiums zum Grauen Kloster (Ost-Berlin)
3. 7. 1955	Reifeprüfung bestanden
1955 - 1957	Besuch der medizinischen Fachschule in Berlin-Friedrichshain
25. 6. 1957	Abschlußprüfung als staatlich anerkannte Krankenschwester abgelegt
1957 - 1958	Arbeit als Krankenschwester auf der internen Station des Krankenhauses Berlin-Friedrichshain
15. 9. 1958	Prüfung zur Anerkennung des Ostberliner Reifezeugnisses beim Senator für Volksbildung Berlin abgelegt
20. 10. 1958	Immatrikulation als Studentin der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
4. 8. 1959	Vorphysikum bestanden
27. 4. 1961	Physikum abgelegt
13. 8. 1961 - 3. 8. 1962	Unterbrechung des Studiums durch den Bau der Berliner Mauer, da wohnhaft in Ostberlin. In dieser Zeit tätig als medizinisch-technische Assistentin in der Zentralen Poliklinik der Bauarbeiter in Berlin-Mitte. Danach Flucht nach West-Berlin.
1962 - 1966	Fortsetzung des Studiums an der FU Berlin
4. 4. 1966	Ärztliche Prüfung an der FU Berlin abgelegt

1. 11. 1966 - 4. 3. 1967	Medizinalassistentin auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Neustadt a. Rbge.
15. 3. 1967 - 31. 10. 1967	Medizinalassistentin auf der internen Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Goslar
1. 11. 1967 - 29. 2. 1968	Medizinalassistentin auf der gynäkologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Salzgitter-Lebenstedt
2. 2. 1968	Verheiratung mit dem Dipl.-Ing. Günter G e r h a r d t
15. 3. 1968	Arbeitsbeginn als Medizinalassistentin im Städtischen Krankenhaus am Mariendorfer Weg, Abteilung Hospital.

Frau Privatdozentin Dr. med. Irene B o l l
danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei
meiner Arbeit.